

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. März 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/16327 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/31, (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, C07K 14/35 AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02924

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. August 2000 (28.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 41 416.5 31. August 1999 (31.08.1999) DE
199 43 520.0 11. September 1999 (11.09.1999) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: NIEDERWEIS, Michael [DE/DE]; Killinger Strasse 108, 91056 Erlangen (DE). BOSSMANN, Stefan [DE/DE]; Haid- und Neustrasse 6, 76131 Karlsruhe (DE).

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelebachstrasse 49A, 91052 Erlangen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/16327 A2

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A CHANNEL-FORMING PROTEIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES KANALBILDENDEN PROTEINS

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a channel-forming protein that is present in gram-positive bacteria. The channel-forming protein is obtained by a) heterologous overexpression or b) purifying mycobacteria, whereby extraction temperature amounts to more than 50 °C.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakterien vorkommenden kanalbildenden Proteins, wobei das kanalbildende Protein gewonnen wird durch a) heterologe Überexpression oder b) Aufreinigung aus Mycobakterien, wobei die Extraktionstemperatur mehr als 50°C beträgt.

This Page Blank (uspto)

Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins, ein kanalbildendes Protein, ein Gen 5 codierend für ein solches Protein und ein mutiertes *mspA*-, *mspC*- oder *mspD*- Gen, einen Plasmidvektor und ein Überexpressionssystem.

Die Erfindung betrifft allgemein das technische Gebiet der 10 Herstellung von Nanostrukturen. Zu den bisher am besten charakterisierten Nanostrukturen gehören Kohlenstoff-Nanokanäle (Yakobson, B. I. und Smalley, R. E. Fullerene nanotubes: C_{1,000,000} and beyond. *Am Sci* **85**, 324, 1997). Mit Kohlenstoff-Nanokanälen konnte gezeigt werden, daß die elektronischen 15 Eigenschaften durch ihre strukturellen Details kontrolliert werden. Die Synthese von Kohlenstoff-Nanokanälen erfolgt durch verschiedene Varianten von CVD (chemical vapor deposition) (Fan, S., Chapline, M. G., Franklin, N. R., Tombler, T. W., Cassell, A. M. und Dai, H. Self-oriented regular 20 arrays of carbon nanotubes and their field emission properties. *Science* **283**, 512-4, 1999) und ist damit sehr aufwendig.

Aus Johnson, S. A., Ollivier, P. J. und Mallouk, T. E. Ordered mesoporous polymers of tunable pore size from colloidal 25 silica templates. *Science* **283**, 963-965 (1999) ist ein Verfahren zur Herstellung von organischen Nanokanälen auf der Grundlage eines Templates bekannt. Damit können Nanokanäle mit einem Durchmesser von 5 bis 35 nm hergestellt werden.

30 Mycobakterien gehören zu einer Untergruppe von Gram-positiven Bakterien, die Mycolsäuren besitzen und die die Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Dietzia* einschließen.

5 Trias, J. und Benz, R. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **14**, 283-290 (1994) beschreiben kanalbildende Proteine, nämlich Porine, in der Mycolsäure-Schicht von Mycobakterien. Biochemische oder molekulargenetische Daten über diese Porine wurden bisher nicht veröffentlicht.

10 Aus Lichtinger, T., Burkovski, A., Niederweis, M., Kramer, R. und Benz, R. Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* **37**, 15024-32 (1998) ist ein Verfahren zur Präparation von Porinen aus Corynebakterien bekannt. Dieses Verfahren ist 15 relativ ineffizient.

20 Mukhopadhyay, S., Basu, D. und Chakrabarti, P. Characterization of a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **179**, 6205-6207 (1997) beschreiben die Extraktion von Porinen aus *M. smegmatis* mit einem Puffer mit 1 % Zwittergent durch Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Ausbeuten waren schlecht und die Verunreinigung mit anderen Proteinen groß.

25 Aus Harth, G. et al., High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infection and Immunity* **65**, 2321-2328 (1997) ist es bekannt, 30 daß eine starke Expression von gering konservierten, *Mycobacterium*-spezifischen Proteinen in *E. coli* nicht möglich zu sein scheint.

Aus Senaratne, R.H. et al., Expression of a Gene for a Porin-Like Protein of the OmpA Family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* **180**, 3541-3547 (1998) ist die Expression eines Gens für ein porinartiges Protein aus *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in *E. coli* bekannt. Die Expression des Gens verursacht einen Abbruch des Bakterienwachstums, weil das exprimierte Protein offensichtlich toxisch für *E. coli* ist. Es können lediglich geringe Mengen des Proteins aus *E. coli* kurz vor dem Absterben der Zellen isoliert werden.

10

Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 26, 15 27, 28, 30, 32, 36, 37, 38, 40 und 41 gelöst. Zweckmäßige Weiterbildungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 25, 29, 31, 33, 34, 35, 39 sowie ggf. 37 und 38.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung 20 eines in Gram-positiven Bakterien vorkommenden kanalbildenden Proteins vorgesehen, wobei das kanalbildende Protein gewonnen wird durch

a) heterologe Überexpression oder

25

b) Aufreinigung aus Mycobakterien, wobei die Extraktions-temperatur mehr als 50°C beträgt.

Unter den kanalbildenden Proteinen werden Proteine verstanden, 30 welche einen wassergefüllten Kanal oder eine wassergefüllte kanalartige Struktur bilden können. Solche Proteine kommen natürlicherweise, insbesondere in der Zellwand von Bakterien, vor. Sie können kanalartige Strukturen oder Kanäle

mit einem Durchmesser bis zu 3 nm und sogar darüber bilden. Die Länge kann bis zu 10 nm und mehr betragen. Die kanalartigen Strukturen oder Kanäle können aus mehreren, insbesondere vier oder acht, Untereinheiten gebildet sein.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren ist wesentlich effizienter als die bisher beschriebenen Verfahren, bietet die Möglichkeit einer weitgehenden Automatisierung der chromatographischen Aufreinigung und ermöglicht eine drastisch erhöhte Ausbeute.

10

Das Gram-positive Bakterium kann ein mindestens eine Mycol-säure enthaltendes Bakterium sein. Nach einer Ausgestaltung ist das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*.

15

Das kanalbildende Protein kann ein Porin sein. Bevorzugt wird ein Porin, das im wesentlichen gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil und/oder bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C, thermisch stabil ist. Stabil bedeutet, daß die kanalartige Struktur des Proteins erhalten bleibt und im wesentlichen keine Denaturierung des Proteins stattfindet.

Das Porin ist vorzugsweise MspA, MspC, MspD, ein Fragment dieser Porine, ein zu diesen Porinen oder deren Fragmenten homologes Protein oder ein von einer Sequenz dieser Porine abgeleitetes Protein ist. MspA weist die Sequenz der Aminosäuren 28 - 211 der Sequenz 3 (siehe unten), MspC die Sequenz 7 und MspD die Sequenz 9 auf. Das zu den genannten Porinen oder deren Fragmenten homologe Protein weist eine ähnliche Struktur wie diese Porine oder Fragmente auf. Mindestens 20 % der Aminosäuren sind identisch oder homolog zu den Aminosäuren dieser Porine oder Fragmente. Eine Aminosäure in

einem Protein ist zu einer anderen Aminosäure homolog, wenn sie durch die andere Aminosäure ersetzt werden kann, ohne daß dadurch die Funktion oder Struktur des Proteins wesentlichen beeinflußt wird. Bei dem von einer der Sequenzen der Porine 5 abgeleiteten Protein können gegenüber diesen Sequenzen einzelne oder mehrere Aminosäuren fehlen oder durch andere Aminosäuren oder Aminosäureanaloga ersetzt sein.

Die genannten Proteine eignen sich wegen ihrer überraschend 10 hohen chemischen und thermischen Stabilität besonders gut zur Herstellung von Nanostrukturen.

Eine gute Ausbeute wird erzielt, wenn die heterologe Überexpression in *E. coli* oder Mycobakterien durchgeführt wird. 15 Zweckmäßigerweise wird zur Überexpression ein für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt. Vorteilhaft ist es weiter, daß zur Überexpression ein *mspA*-Gen gemäß Sequenz 1 (siehe unten), ein *mspC*-Gen gemäß Sequenz 6 oder ein *mspD*-Gen gemäß Sequenz 8 benutzt wird. 20 Zur Überexpression kann auch ein von den Sequenzen 1, 6 oder 8 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt werden, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen denen von *MspA*, *MspC* oder *MspD* entspricht. 25 Die Mutation kann auch im wesentlichen in einer Angleichung der Codons des *mspA*-Gens, des *mspC*-Gens oder des *mspD*-Gens an die Codons der in *E. coli* hoch exprimierten Gene bestehen. Solche Codons sind aus Nakamura, T. et al., Two types of linkage between codon usage and gene-expression 30 levels. *FEBS Lett.* **289**, 123-125 (1991) bekannt.

Zur Überexpression kann auch ein mutiertes *mspA*-, *mspC*- oder *mspD*-Gen benutzt werden, wobei die Mutation im wesentlichen

darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist.- Die Anpassung der Codon-Benutzung verbessert die Überexpression von MspA, MspC und MspD in *E. coli* erheblich.

5 Durch Herstellung des kanalbildenden Proteins MspA aus *E. coli* kann die Ausbeute gegenüber dem oben beschriebenen Verfahren zur Präparation des nativen Proteins noch einmal um den Faktor 10 bis 20 gesteigert werden.

10 Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 zu benutzen. Dazu kann ein zur Überexpression in *E. coli* geeigneter Vektor verwendet werden, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist. Solche geeigneten Vektoren sind z.B. von Hannig, G. und Makrides, 15 S.C. in Trends in Biotechnology, 1998, Vol. 16, pp54 beschrieben. Der Offenbarungshalt dieses Dokuments wird hiermit einbezogen.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, die kanalbildenden Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien zu gewinnen. Die Detergentien können aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)_n, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthioglucoside, besonders Octylthioglucosid, Octyl-Polyethylenoxide und Lauryldimethylaminoxid. Es ist zweckmäßigerweise eine zweifache oder höhere kritische micellare Konzentration (CMC) in einem Phosphatpuffer (100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6,5, 150 mM NaCl) eingestellt 25 worden. - Die zwitterionischen und nicht-ionischen Detergentien lösen insbesondere das kanalbildende Protein MspA sehr selektiv und mit guter Ausbeute aus der Zellwand von *M. smegmatis*.

Es hat sich weiter als zweckmäßig erwiesen, daß die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110 °C, vorzugsweise zwischen 90 und 100 °C, und/oder die Extraktionszeit 5 bis 5 120 Minuten, vorzugsweise 25 – 35 Minuten, beträgt. Vorteilhaft ist weiter die Benutzung eines Puffers mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat.

10 Insbesondere eine Durchführung der Extraktion bei 100 °C, die Verwendung eines Puffers mit hoher Ionenstärke sowie zwittrionischer und nicht-ionischer Detergentien verbessern das Extraktionsverfahren für Porine aus *Mycobacterium smegmatis*. Es bietet gegenüber den bisherigen Verfahren zur Aufreinigung solcher Proteine mit Hilfe organischer Lösungsmittel oder der 15 Extraktion bei Raumtemperatur folgende Vorteile:

- aa) Verzicht auf organische Lösungsmittel
- bb) geringe Verunreinigungen mit anderen Proteinen
- cc) effiziente Extraktion

20 Es ist auch möglich, MspA zur Aufreinigung in Dimethylsulfoxid bei einer Temperatur im Bereich von 50 – 110 °C zu lösen; danach kann die Lösung vom Rückstand getrennt und MspA durch Abkühlen ausgefällt werden.

25 Vorteilhafterweise wird das kanalbildende Protein zur Aufreinigung, insbesondere mittels Aceton, ausgefällt. Dabei kann es zu einer Anreicherung des kanalbildenden Proteins gegenüber nicht ausfallenden Proteinen kommen. Weiterhin ist es 30 vorteilhaft, das Protein zur Aufreinigung einer Ionenaustauscher-Chromatographie, insbesondere einer Anionenaustauscher-Chromatographie, zu unterwerfen. Zur weiteren Aufreini-

gung kann das kanalbildende Protein einer Größenausschluß-Chromatographie unterworfen werden.

Das durch heterologe Überexpression gewonnene kanalbildende
5 Protein kann durch Erhöhen der lokalen Konzentration des ka-
nalbildenden Proteins renaturiert werden. Das Erhöhen der lo-
kalen Konzentration kann durch elektrophoretische Anreiche-
rung, insbesondere durch Anlegen einer Gleichspannung, durch
Ausfällen oder durch Adsorption an einer Oberfläche, insbe-
10 sondere einer Membran, erfolgen. Zweckmäßig ist das Anlegen
einer Gleichspannung im Bereich von 50 V für eine Zeit von
etwa 30 Minuten.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein kanalbildendes
15 Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach
dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Das Gram-positive Bakterium kann ein Mycolsäure enthaltendes
Bakterium sein, wobei zweckmäßigerweise das Bakterium ein My-
20 kobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*, ist.

Von besonderem Vorteil ist es, daß das kanalbildende Protein
ein Porin ist, das im wesentlichen gegenüber organischen Lö-
sungsmitteln chemisch stabil ist. Das Porin ist vorzugsweise
25 im wesentlichen bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugswei-
se 100°C, thermisch stabil. Es kann sich dabei um das Porin
MspA, MspC, MspD, ein Fragment dieser Porine, ein zu diesen
Porinen oder deren Fragmenten homologes Protein oder ein von
der Sequenz dieser Porine abgeleitetes Protein handeln. Die
30 chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige
Struktur des abgeleiteten Proteins kann im wesentlichen der-
jenigen der Proteine MspA, MspC oder MspD entsprechen. Es ist
aber auch denkbar, daß weitere hier nicht genannte Porine

diese Eigenschaften aufweisen und damit vom Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Die erfindungsgemäßen kanalbildenden Proteine haben die folgenden Vorteile:

10 aaa) Soweit die kanalbildenden Proteine in der Zellwand von *M. smegmatis* enthalten sind, lassen sie sich daraus in organischen Lösungsmitteln (z. B. CHCl₃/MeOH) lösen, ohne zu denaturieren. Die Fähigkeit zur Kanalbildung bleibt in organischen Lösungsmitteln erhalten.

bbb) Sie lassen sich mit Aceton fällen, ohne zu denaturieren.

15 ccc) Sie überstehen selbst Kochen in Detergentien (z. B. 10 Minuten in 3% SDS), ohne zu denaturieren.

20 Diese extreme Stabilität der erfindungsgemäßen Proteine gegenüber chemischer und thermischer Denaturierung ermöglicht deren Verwendung zur Herstellung von technisch verwertbaren Nanostrukturen.

Nach Maßgabe der Erfindung wird weiterhin ein für ein erfindungsgemäßes kanalbildendes Protein codierendes Gen beansprucht. Das kann das mspA-Gen gemäß Sequenz 1, das mspC-Gen 25 gemäß Sequenz 6 oder das mspD-Gen gemäß Sequenz 8 sein.

Als weiterer Gegenstand kommt auch ein mutiertes mspA-Gen, mspC-Gen oder mspD-Gen in Betracht, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons des mspA-Gens, des mspC-Gens oder des mspD-Gens an die Codons der in *E. coli* hoch exprimierten Gene besteht. Die Mutation kann im wesentlichen darin bestehen, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66%

vermindert ist. Das mutierte Gen kann aber auch von einer der Sequenzen 1, 6 oder 8 abgeleitet und so ausgebildet sein, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen der von 5 MspA, MspC oder MspD entspricht. Weitere hier nicht genannte Mutationen sind für den Fachmann ebenfalls denkbar. Gene, die zur Ausbildung der erfindungsgemäßen kanalartigen Proteine führen, sind vom beanspruchten Schutzmfang umfaßt. Z.B. ein mutiertes *mspA*-Gen, wobei das mutierte Gen das *synmspA*-Gen 10 gemäß Sequenz 4 (siehe unten) ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist der Plasmidvektor pMN501 und ein Überexpressionssystem, bei dem *E. coli* diesen Plasmidvektor enthält.

15

Nachfolgend werden anhand der Figuren Beispiele der Erfindung erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a-c die Temperaturabhängigkeit der Extraktion von MspA 20 aus *M. smegmatis* in gelelektrophoretischer Darstellung,

Fig. 2 die Reinigung von MspA aus *M. smegmatis* in gelek- 25 trophoretischer Darstellung,

Fig. 3 die Reinigung von MspA aus *E. coli* in gelektrophoretischer Darstellung,

Fig. 4 die Konstruktion des Plasmidvektors pMN501,

Fig. 5 eine schematische Ansicht einer Vorrichtung zur 30 Renaturierung,

Fig. 6 ein renaturiertes MspA in gelelektrophoretischer Darstellung und

Fig. 7a-c Modifikationen des Kanalproteins MspA in elektro-
5 nennmikroskopischer Darstellung.

Bei allen gelelektrophoretischen Darstellungen von Proteinen sind die Proteine 30 Minuten bei Raumtemperatur in Probenpuffer (40 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 7,0, 3% SDS, 8% 10 Glycerin, 0,1% Serva Blau G) inkubiert und dann gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt worden.

Die Figuren 1a-c zeigen bei verschiedenen Temperaturen aus *M. smegmatis* extrahierte Proteine. Fig. 1a zeigt ein mit Coo-
15 massie Blau gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel. Spur M: Massenstandard mit 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31, 21,5 und 14,4 kDa. Spuren 1 bis 8: je 12 µl von bei 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100°C erhaltenen Extrakten.

20 Fig. 1b zeigt einen Immunoblot eines 8%-igen SDS-Polyacrylamidgels auf einer PVDF-Membran. Die Proteine wurden unter Verwendung eines gegen MspA gerichteten Antiserums aus Kaninchen und einer Chemilumineszenz-Reaktion (ECL-Detektionssystem, Amersham-Pharmacia, Wien, Österreich) 25 sichtbar gemacht. Spur M: Massenstandard mit 97,4, 68, 46, 31, 20,1 und 14,4 kDa. Spuren 1 bis 3: Je 2 µl eines bei 30, 40 oder 50°C erhaltenen Extrakts. Spuren 4 bis 8: Je 1 µl eines bei 60, 70, 80, 90 oder 100°C erhaltenen Extrakts. Spur 9: 1 ng MspA.

30 Fig. 1c zeigt ein mit Silber gefärbtes 8%-iges SDS-Polyacrylamidgel. Spur M: Massenstandard mit 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31, 21,5 und 14,4 kDa. Spur 1 und 2:

Je 15 μ l eines bei 30 oder 40°C gewonnenen Extrakts. Spur 3: 10 μ l eines bei 50°C gewonnenen Extrakts. Spuren 4 bis 8: Je 4 μ l eines bei 60, 70, 80, 90 oder 100°C erhaltenen Extrakts. Spur 9 zeigt 270 ng aufgereinigtes MspA.

5

Fig. 2 zeigt ein mit Coomassie Blau gefärbtes 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Spur M: Massenstandard: 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31, 21,5 und 14,4 kDa. Spur 1: 40 μ g Protein eines aus *M. smegmatis* mit POP05-Puffer (100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6,5, 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5 % Octylpolyethylenoxid (OPOE)) gewonnenen Extrakts. Spur 2: 40 μ g Protein aus dem Extrakt nach Fällung mit Aceton. Spur 3: 4 μ g Protein aus vereinigten MspA enthaltenden Fraktionen einer Anionenaustauscher-Chromatographie. Spur 4: 4 μ g Protein der MspA enthaltenden Fraktionen nach Fällung mit Aceton. Spur 5: 4 μ g Protein aus vereinigten MspA enthaltenden Fraktionen nach Größenausschluß-Chromatographie. Die Sequenzen des mspA-Gens, des mspA-Gens + Promotor sowie des MspA-Proteins mit vermuteter Signalsequenz sind im Sequenzprotokoll als Sequenzen 1 - 3 wiedergeben.

Fig. 3 zeigt die Reinigung des Kanalproteins MspA aus *E. coli*. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach Größe getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blau gefärbt. Spur 1: Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 vor der Induktion durch IPTG. Spur 2: Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 nach der Induktion durch IPTG. Spur 3: Massenstandard: 200, 116, 97, 66, 55, 36,5, 31, 21,5, 14,4 und 6 kDa. Die Proben wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

In Fig. 4 ist schematisch die Konstruktion des Plasmids pMN501 zur Überexpression von MspA in *E. coli* BL21(DE3) dargestellt. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

5 lacI: Gen codierend für den Laktose-Repressor
nptI: Gen codierend für die Neomycinphosphotransferase; sie vermittelt Kanamycinresistenz
Ori: Replikationsursprung
RBS: Ribosomenbindestelle

10

Fig. 5 zeigt schematischen eine Vorrichtung zur Renaturierung von monomerem MspA. Eine Pipettenspitze aus Polyethylen von 5 cm Länge, deren unteres Ende nach ca. 2 mm abgeschnitten wurde, wurde mit einer 1.7 %igen Agarose-Lösung (in TAE-Puffer) gefüllt. Eine Bleistiftmine (Typ: Eberhard Faber, 3H) wurde auf eine Länge von 5 cm gekürzt. Ein Polypropylengefäß ohne Deckel wurde mit 60 μ l einer Lösung mit 5 μ g denaturiertem MspA gefüllt und die Pipettenspitze und die Bleistiftmine in die Lösung gestellt. Dann wurde die Pipettenspitze als Kathode und die Bleistiftmine als Anode angeschlossen.

20

Fig. 6 zeigt die Renaturierung von denaturiertem MspA. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger getrennt (Schägger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79 (1987)). Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Spur M: Massenstandard: 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa; Spur 1: 800 ng denaturiertes MspA. Spur 2: 800 ng MspA nach der Renaturierungsreaktion. Die Proben wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

Die Fig. 7a bis 7c zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Modifikationen des Kanalproteins MspA aus *M. smegmatis*. Die Herstellung der Proben erfolgt nach folgendem Protokoll: Ein Milliliter einer Lösung des Kanalproteins MspA ($c(MspA) = 5 \ 17,2 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6,5, 150 mM NaCl, 0,10 g/L SDS) werden bei 24,5°C in einem Ultraschallbad dispergiert. Zwischen der Flüssigkeitsoberfläche und einer HOPG (Kohlenstoff) - Oberfläche ($1,0 \text{ mm}^2$) wird ein konstanter Abstand von 5,0 cm eingestellt. Die HOPG-Oberfläche wird für 10 20 Sekunden den dispergierten Flüssigkeitströpfchen ausgesetzt.

In Fig. 7a liegen isolierte Kanalproteine vor. In Fig. 7b ist eine Bänderstruktur erkennbar, die große Poren mit einem Durchmesser von 12 nm aufweist. Aus Fig. 7c ist ersichtlich, daß die Bänderstruktur zwei Typen von Kanälen beitzt, nämlich erste Kanäle mit einem kleinen Durchmesser von etwa 2.4 nm und zweite Kanäle mit größeren Durchmesser von etwa 9.0 bis 10,0 nm.

20

Beispiel 1: Extraktion von MspA aus *M. smegmatis* bei verschiedenen Temperaturen

10 mg *M. smegmatis* mc²155-Zellen (Naßgewicht) wurden mit PBS (100 mM Natriumphosphat, pH 7,0, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) gewaschen und in 150 μl PG05-Puffer (0,5 % Isotridecylpolyethylen glycolether, 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 6,5) resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden für 30 Minuten bei 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100°C inkubiert. Die Proben wurden für 10 Minuten auf Eis gekühlt 30 und für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Volumen des Überstands wurde durch Verdampfen von 120 auf 10 μl reduziert. Die Proteine wurden geelektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt, wie es in den Figuren 1a-c gezeigt ist. Der

Anteil von MspA an dem insgesamt extrahierten Protein nimmt bei Temperaturen über 50°C deutlich zu. Andere Proteine werden bei diesen Temperaturen kaum noch extrahiert.

5 Beispiel 2: Aufreinigung von MspA aus *M. smegmatis*

10 g *M. smegmatis* (Naßgewicht) wurden mit PBS gewaschen, in 35 ml POP05-Puffer resuspendiert und unter Rühren für 30 Minuten in einem Wasserbad gekocht. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4°C für 15 Minuten bei 10 27000 g zentrifugiert. 42 ml des Überstands wurden vorsichtig mit einem gleichen Volumen eisgekühlten Acetons gemischt. Die Mischung wurde eine Stunde auf Eis gekühlt und bei 4°C für 15 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Das ausgefällte Protein wurde in 10 ml 25 mM AOP05 (*N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-2-15 ethansulfonsäure (Hepes), pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,5 % OPOE) gelöst und auf eine Anionenaustauscher-Säule POROS 20HQ mit einem Volumen von 1,7 ml (Perseptive Biosystems, Cambridge, MA) geladen. Nach Waschen der Säule mit 14 ml AOP05 wurden gebundene Proteine mit einem Gradienten von 100% AOP05 bis 20 100 % BOP05 (25 mM Hepes, pH 7,5, 2 M NaCl, 0,5 % OPOE) über 34 ml eluiert. Es wurden 90 1 ml-Fraktionen gesammelt und ge-25 elektrophoretisch analysiert. MspA eluierte zwischen 0,48 und 0,74 M NaCl mit einem Peak bei 0,57 M NaCl. Die 4 Frak-30 tionen mit der höchsten MspA-Menge wurden vereinigt und mit Aceton gefällt. Das resultierende Pellet wurde in 600 µl AOP05 aufgenommen, auf Eis inkubiert und bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert um unlösliches Material zu entfernen. Die resultierende Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 Gelfiltrations-Säule mit einem Volumen von 24 ml (Pharmacia, 35 Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Proteine wurden mit 48 ml AOP05 bei einer Flußrate von 0,2 ml/Minute eluiert. 50 1 ml-Fraktionen wurden gesammelt und geelektrophoretisch analy-40 siert. Fraktionen mit nahezu reinem MspA wurden vereinigt.

Die einzelnen Reinigungsstufen sind aus Fig. 2 ersichtlich. Die Ausbeute beträgt 700 µg. 1 µg dieser Probe zeigte in einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel keinerlei Kontaminationen mit anderen Proteinen (nicht gezeigt). MspA ist bis 5 oder nahezu bis zur Homogenität aufgereinigt worden.

Beispiel 3: Verfahren zur Präparation des Kanalproteins MspA aus *E. coli*

10 Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute an MspA wird eine Überexpression des entsprechenden Gens vorgeschlagen. Zunächst wird das *mspA*-Gen kloniert, das für das Kanalprotein MspA aus *Mycobacterium smegmatis* mc²155 kodiert. Es wird das T7-Expressionssystem für die Überexpression des *mspA*-Gens ge-
15 wählt.

Das *mspA*-Gen wird aus dem Plasmid pPOR6 über PCR amplifi-
ziert. In der nativen *mspA*-Sequenz werden alle Codons verän-
dert, die in stark exprimierten Genen aus *Escherichia coli*
20 selten vorkommen. Im Sequenzprotokoll (siehe unten), sind in
Sequenz 4 alle eingeführten Mutationen aufgelistet. Diese
synmspA genannte DNA wird nach der Methode von Stemmer (Stem-
mer, W. P., Crameri, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. and Heyne-
ker, H. L. Single-step assembly of a gene and entire plasmid
25 from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 164,
49-53 (1995)) durch Assemblierung von Oligonucleotiden syn-
thetisiert und anstelle des *mspA*-Gens in den Vektor pMN500
eingesetzt. Das resultierende Plasmid pMN501 (Fig. 4) vermit-
telt in Zellen von *E. coli* BL21(DE3) eine starke Expression
30 von denaturiertem MspA-Monomer (20 kDa) nach Induktion mit
IPTG. Das so exprimierte rMspA genannte Protein weist die Se-
quenz 5 (siehe unten) auf.

Beispiel 4: Aufreinigung von MspA aus *E. coli*

Ein Liter LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin wird mit *E. coli* BL21(DE3)/pMN500 beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 5 0.6 geschüttelt. Dann wird mit 1 mM IPTG induziert und die Zellen noch sechs Stunden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 2.2 geschüttelt. Die Zellen werden in 40 mL A-Puffer (25 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM NaCl) resuspendiert und durch zehnminütiges Kochen in Wasser aufgeschlossen. Nach einer zehnminütigen 10 Inkubation auf Eis werden die Zelltrümmer und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation bei 10000 g für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand wird an einem Anionenaustauscher (POROS HQ20) mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 mM bis 15 2 M NaCl getrennt. Monomeres MspA eluiert bei 350 mM NaCl. Um höhermolekulare Proteine abzutrennen, werden die Fraktionen mit MspA vereinigt und es wird eine Gelfiltration durchgeführt. Die Ausbeute beträgt 10 mg MspA mit einer Reinheit von über 95 % (Daten nicht gezeigt).

20 Beispiel 5: Elektrochemische Assemblierung des Kanalproteins MspA

Durch die Überexpression von MspA in *E. coli* ist es zwar leicht möglich, das Kanalprotein mit einer guten Ausbeute zu isolieren. Das gewonnene Protein liegt zum großen Teil in inaktivier Form vor. Die Überführung in die aktive Form bzw. Renaturierung von monomerem MspA kann nach folgendem Protokoll 25 erfolgen:

Die Renaturierung kann in einer für diesen Zweck entwickelten 30 Apparatur stattfinden (Fig. 5). Die Renaturierungsreaktion wird mit 5 µg MspA in monomerer Form in dieser Reaktionsapparatur durch Anlegen einer Spannung von 50 V für 30 Minuten durchgeführt. Zum Schluß wird die Spannung für

fünf Sekunden umgepolt, um an der Bleistiftmine adsorbiertes Porin wieder zu lösen.

Das Protein wird nach der oben beschriebenen Renaturierungsreaktion in einem Proteingel untersucht (Fig. 6). Dabei stellt sich heraus, daß ein großer Teil des Proteins zu oligomeren Einheiten assembliert ist. Durch Rekonstitutionsexperimente kann gezeigt werden, daß das MspA in dieser Form wieder hohe Kanalaktivität besitzt. Das beweist, daß die Renaturierung von MspA durch geringe Gleichspannungen möglich ist.

Diese Renaturierungsreaktion ist sehr einfach durchzuführen und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Präparation von funktionalem Kanalprotein MspA aus überproduzierenden *E. coli*.

Liste der Sequenzen:

1. mspA-Gen, translatiert
- 20 2. mspA-Gen + Promotor, translatiert
3. MspA-Proteins mit vermuteter Signalsequenz
4. synmspA-Gen, translatiert
5. rMspA-Protein
6. mspC-Gen
- 25 7. MspC-Protein
8. mspD-Gen
9. mspD-Protein

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakterien vorkommenden kanalbildenden Proteins, wobei das kanalbildende Protein gewonnen wird durch
 - 5 a) heterologe Überexpression oder
 - b) Aufreinigung aus Mycobakterien, wobei die Extraktions-10 temperatur mehr als 50°C beträgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Gram-positive Bakterium ein mindestens eine Mycolsäure enthaltendes Bakterium ist.
15
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*, ist.
20
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das kanalbildende Protein ein Porin ist.
25
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Porin im wesentlichen gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil ist.
30
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Porin im wesentlichen bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C, thermisch stabil ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Porin MspA, MspC, MspD, ein Fragment dieser Porine, ein zu diesen Porinen oder deren Fragmenten homologes Protein

oder ein von einer Sequenz dieser Porine abgeleitetes Protein ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 5 die heterologe Überexpression in *E. coli* oder Mycobakterien durchgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 10 zur Überexpression ein für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 15 zur Überexpression ein *mspA*-Gen gemäß Sequenz 1, ein *mspC*-Gen gemäß Sequenz 6 oder ein *mspD*-Gen gemäß Sequenz 8 benutzt wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 20 zur Überexpression ein von den Sequenzen 1, 6 oder 8 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt wird, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen denen von *MspA*, *MspC* oder *MspD* entspricht.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 25 die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons des *mspA*-Gens, des *mspC*-Gens oder des *mspD*-Gens an die Codons der in *E. coli* hoch exprimierten Gene besteht.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 30 zur Überexpression ein mutiertes *mspA*-, *mspC*- oder *mspD*-Gen benutzt wird, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 benutzt wird.

5 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein zur Überexpression in *E. coli* geeigneter Vektor verwendet wird, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist.

10 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die kanalbildenden Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien gewonnen werden.

15 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detergentien aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)_n, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthioglucoside, besonders Octylthioglucosid, Octyl-Polyethylenoxide und Lauryldimethylaminoxid.

20 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110°C, vorzugsweise zwischen 90 und 100°C beträgt.

25 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Extraktionszeit 5 bis 120 Minuten, vorzugsweise 25 - 35 Minuten, beträgt.

30 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Puffer mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat benutzt wird.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das kanalbildende Protein zur Aufreinigung, insbesondere mittels Aceton, ausgefällt wird.

5 22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das kanalbildende Protein zur Aufreinigung einer Ionenaustauscher-Chromatographie, insbesondere einer Anionenaustauscher-Chromatographie, unterworfen wird.

10 23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das kanalbildende Protein zur Aufreinigung einer Größenausschluß-Chromatographie unterworfen wird.

15 24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das durch heterologe Überexpression gewonnene kanalbildende Protein durch Erhöhen der lokalen Konzentration des kanalbildenden Proteins renaturiert wird.

20 25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Erhöhen der lokalen Konzentration durch elektrophoretische Anreicherung, insbesondere durch Anlegen einer Gleichspannung, durch Ausfällen oder durch Adsorption an einer Oberfläche, insbesondere einer Membran, erfolgt.

25 26. Kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach dem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

30 27. Kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium, wobei das kanalbildende Protein ein Porin ist, das im wesentlichen gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil ist.

28. Kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium, wobei das kanalbildende Protein ein Porin ist, das im wesentlichen bis zu einer Temperatur von 80°C thermisch stabil ist.

5

29. Kanalbildendes Protein nach Anspruch 28, wobei das kanalbildende Protein ein Porin ist, das im wesentlichen bis zu einer Temperatur von 100°C thermisch stabil ist.

10 30. Kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium, wobei das kanalbildende Protein das Porin MspA, MspC, MspD, ein Fragment dieser Porine, ein zu diesen Porinen oder deren Fragmenten homologes Protein oder ein von der Sequenz dieser Porine abgeleitetes Protein ist.

15

31. Kanalbildendes Protein nach Anspruch 30, wobei die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des abgeleiteten Proteins im wesentlichen derjenigen der Proteine MspA, MspC oder MspD entspricht.

20

32. Gen codierend für ein kanalbildendes Protein nach einem der Ansprüche 26 - 31.

25 33. Gen nach Anspruch 32, wobei das Gen das mspA-Gen gemäß Sequenz 1 ist.

34. Gen nach Anspruch 32, wobei das Gen das mspC-Gen gemäß Sequenz 6 ist.

30 35. Gen nach Anspruch 32, wobei das Gen das mspD-Gen gemäß Sequenz 8 ist.

36. Mutiertes mspA-Gen, mspC-Gen oder mspD-Gen, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons des mspA-Gens, des mspC-Gens oder des mspD-Gens an die Codons der in *E. coli* hoch exprimierten Gene besteht.

5

37. Mutiertes mspA-Gen, mspC-Gen oder mspD-Gen, insbesondere nach Anspruch 36, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist.

10

38. Mutiertes mspA-Gen, mspC-Gen oder mspD-Gen, insbesondere nach Anspruch 36 oder 37, abgeleitet von einer der Sequenzen 1, 6 oder 8, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige

15 Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen der von MspA, MspC oder MspD entspricht.

39. Mutiertes mspA-Gen nach einem der Ansprüche 36 bis 38, wobei das mutierte Gen das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 ist.

20

40. Plasmidvektor pMN501.

41. Überexpressionssystem, bei dem *E. coli* den Plasmidvektor pMN501 enthält.

25

1/6

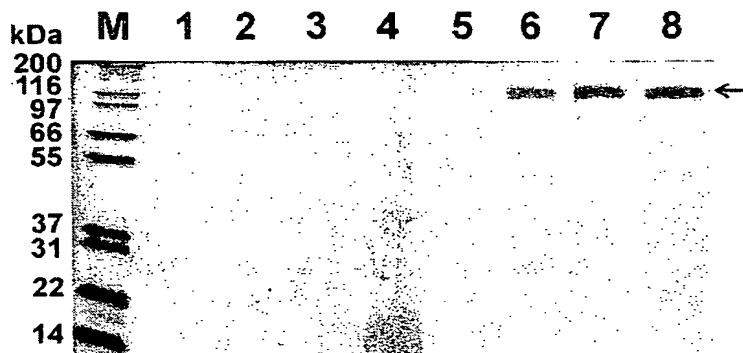


Fig. 1a

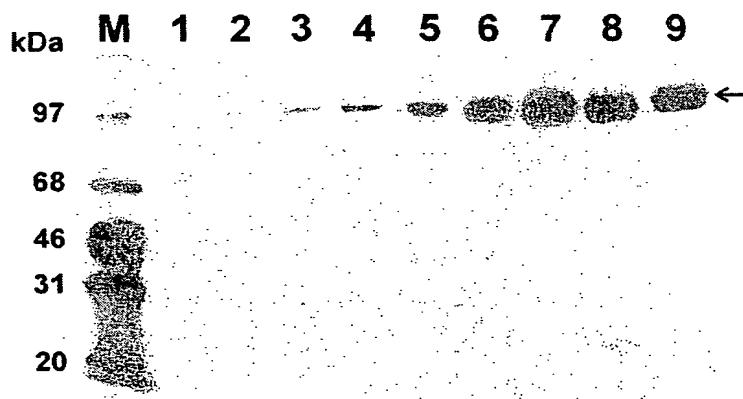


Fig. 1b

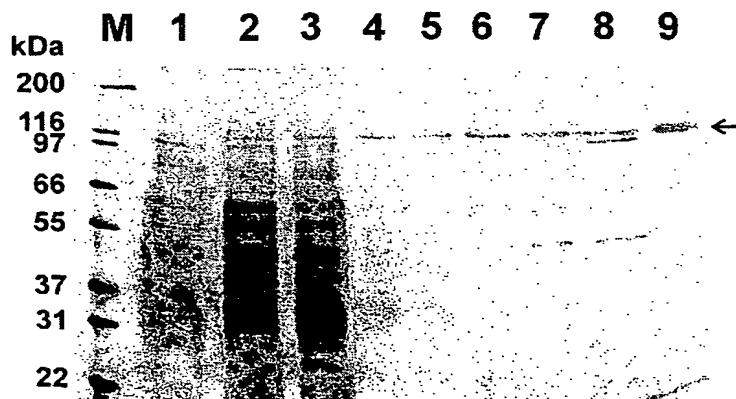
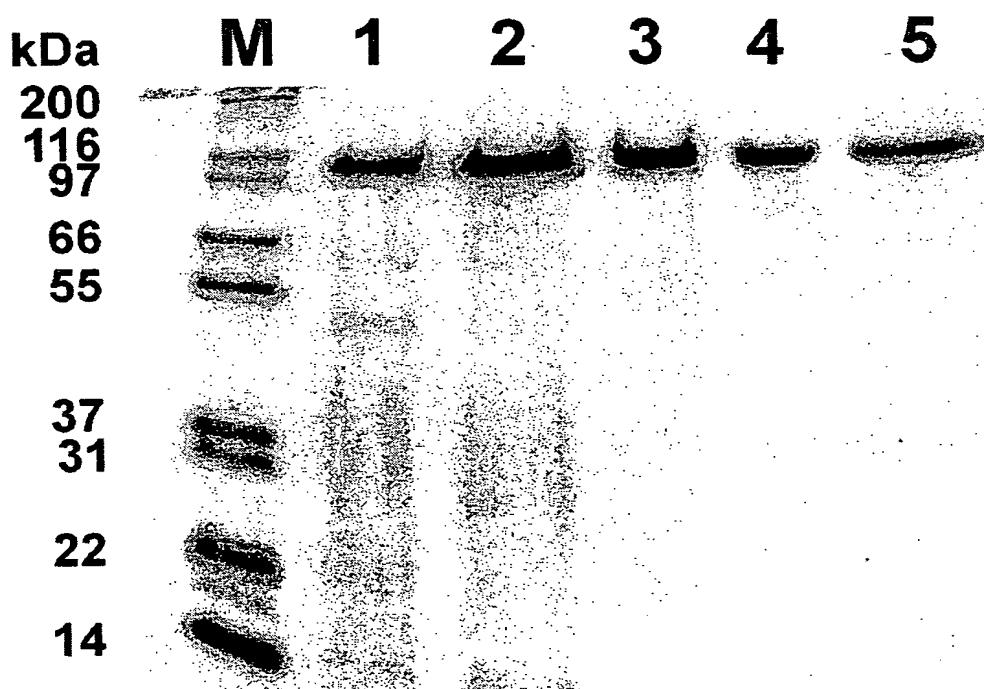


Fig. 1c

BEST AVAILABLE COPY

This Page Blank (uspto)

2/6

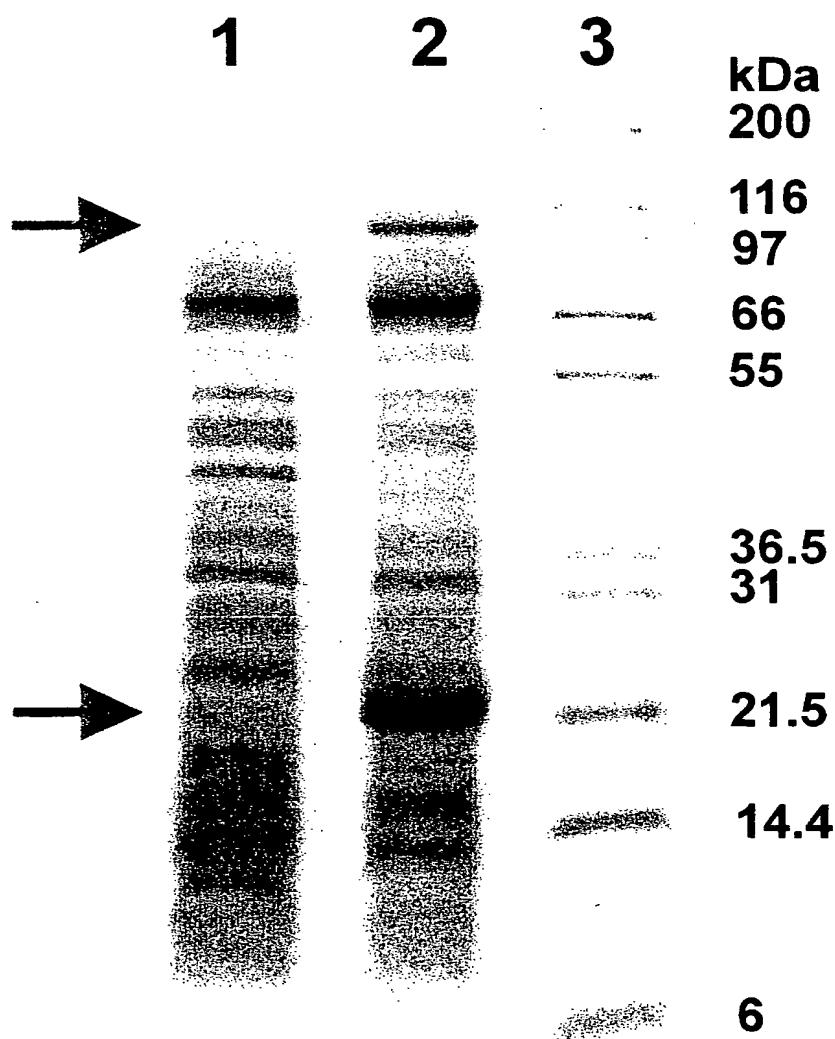


BEST AVAILABLE COPY

Fig. 2

This Page Blank (uspto)

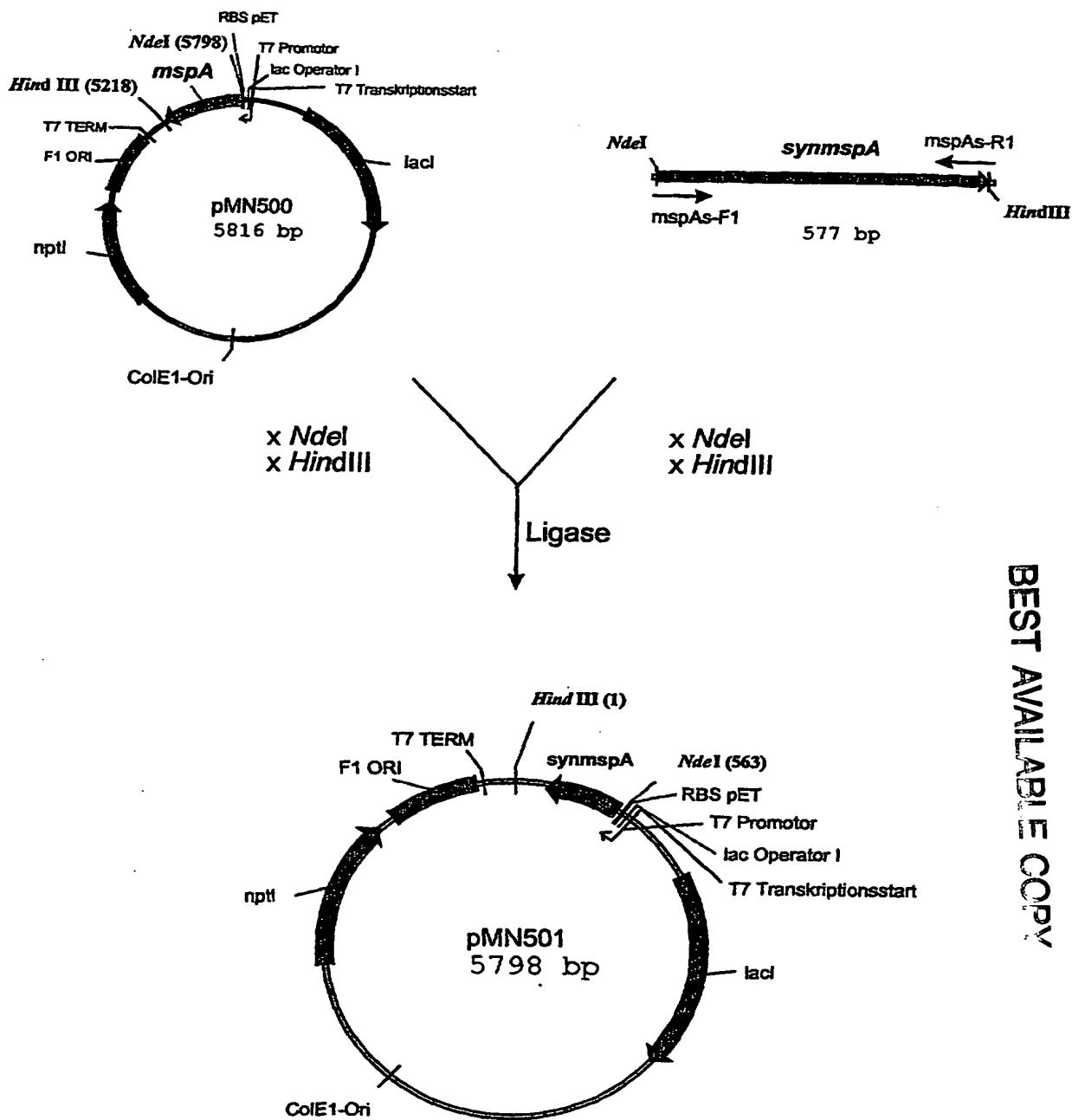
3/6



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 3

This Page Blank (uspto)



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 4

This Page Blank (uspto)

5/6

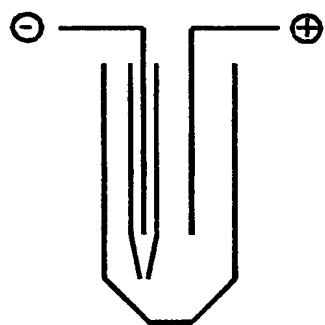


Fig. 5

BEST AVAILABLE COPY

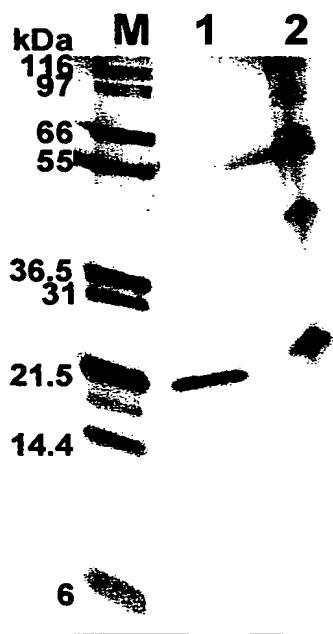


Fig. 6

This Page Blank (uspio)

6/6

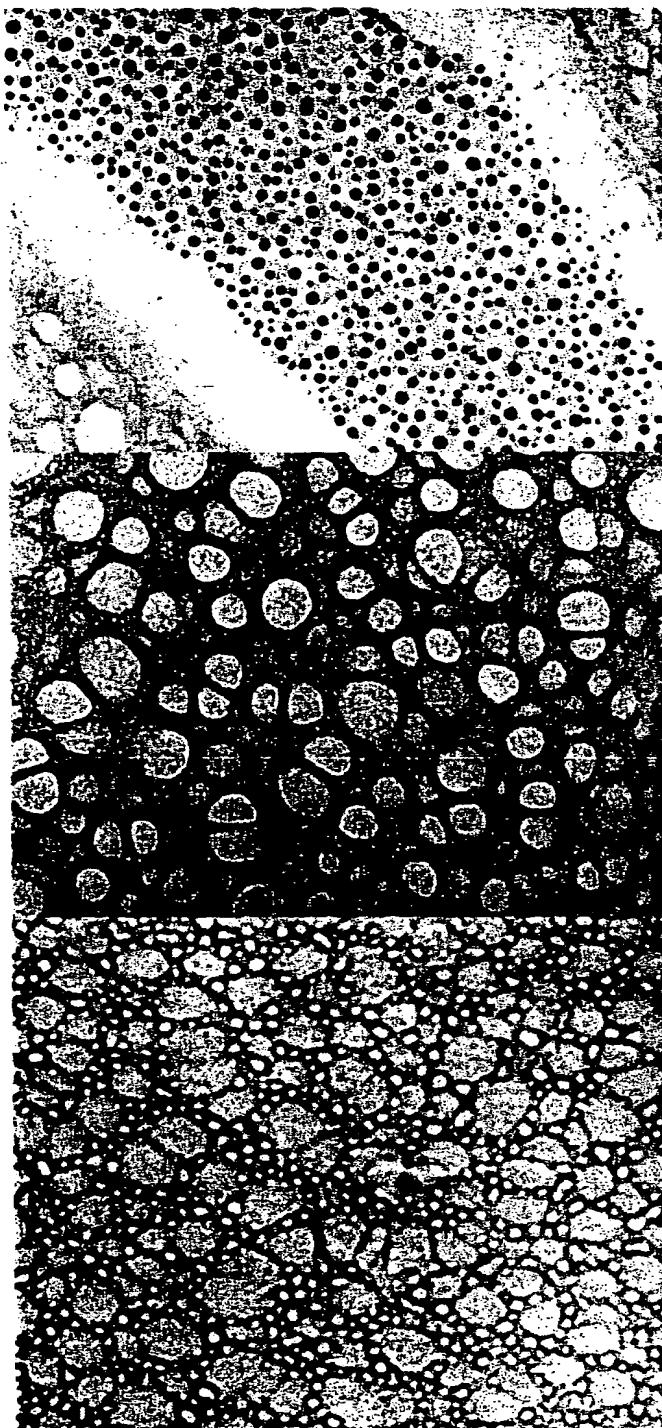


Fig. 7a

Fig. 7b

Fig. 7c

BEST AVAILABLE COPY

This Page Blank (uspto)

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Niederweis Dr., Michael
 Bossmann Dr., Stefan
 10 <120> Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins
 <130> 401172
 15 <140>
 <141>
 <150> DE 199 43 520.0
 <151> 1999-09-11
 <150> DE 199 41 416.5
 <151> 1999-08-31
 20 <160> 9
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 25 <210> 1
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> *Mycobacterium smegmatis*
 30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(636)
 <223> *mspA*-Gen
 35 <400> 1
 atg aag gca atc agt cgg gtg ctg atc gcg atg gtt gca gcc atc gcg
 Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala 48
 1 5 10 15
 40 gcg ctt ttc acg agc aca ggc acc tct cac gca ggc ctg gac aac gag
 Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu 96
 20 25 30
 45 ctg agc ctc gtt gat ggc cag gac cgc acc ctc acc gtc cag cag tgg
 Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp 144
 35 40 45
 50 gac acc ttc ctc aat ggt gtg ttc ccc ctg gac cgc aac cgt ctt acc
 Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr 192
 50 55 60
 55 cgt gag tgg ttc cac tcc ggt cgc gcc aag tac atc gtc gcc ggc ccc
 Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro 240
 65 70 75 80
 60 ggt gcc gac gag ttc gag ggc acg ctg gaa ctc ggc tac cag atc ggc
 Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly 288
 85 90 95
 60 ttc ccg tgg tcg ctg ggt gtg ggc atc aac ttc agc tac acc acc ccg
 Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro 336
 100 105 110

This Page Blank (uspto)

	aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc gct ccg ccg ttc ggc ctg	384
	Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu	
	115 120 125	
5	aac tcg gtc atc acc ccg aac ctg ttc ccc ggt gtg tcg atc tcg gca	432
	Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala	
	130 135 140	
10	gat ctg ggc aac ggc ccc ggc atc cag gaa gtc gca acg ttc tcg gtc	480
	Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val Ala Thr Phe Ser Val	
	145 150 155 160	
15	gac gtc tcc ggc gcc gag ggt ggc gtg gcc gtg tcg aac gcc cac ggc	528
	Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Val Ala Val Ser Asn Ala His Gly	
	165 170 175	
20	acc gtg acc ggt gcg gcc ggc ggt gtg ctg ctg cgt ccg ttc gcc cgc	576
	Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Arg Pro Phe Ala Arg	
	180 185 190	
	ctg atc gcc tcg acc ggt gac tcg gtc acc acc tac ggc gaa ccc tgg	624
	Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr Tyr Gly Glu Pro Trp	
	195 200 205	
25	aac atg aac tga	636
	Asn Met Asn	
	210	
30		
	<210> 2	
	<211> 1423	
35	<212> DNA	
	<213> <i>Mycobacterium smegmatis</i>	
	<220>	
	<221> -10_signal	
40	<222> (323)..(328)	
	<223> vermuteter Promotor	
	<220>	
	<221> CDS	
45	<222> (499)..(1134)	
	<223> <i>mspA</i> -Gen	
	<220>	
	<221> RBS	
50	<222> (492)..(496)	
	<223> vermutete Ribosomenbindestelle	
	<400> 2	
	gttaacggag tcggggccgtc gatacggcg gg cgaagatcat ccggcagatt ggccgcctgg 60	
55	taaaccccgcg taaacactgg taccggccgtt ccgcgcggaa aaagggttttgc ctcacgggt 120	
	aatatgtgac ctgaattgca cttcacgggtt aaaagcggag gtaaccgacg gttgccgcag 180	
60	caccctcaca gcttgggcca aggtgacgtg cagcgcacgc ctgcccgtgc cggatggcgg 240	

This Page Blank (uspto)

	tcacccgaaaa gtgtcaggca ctgccgaaag gtcagtcagc aaacttcact gcccgtgtgg 300	
	tgcgaagtgc gggtgtggga cgtatccgtt gctgccgcgc gccctggcgt ttatgtttct 360	
5	gctgccaact gtgagcgagg cattagagac agatgtgatc ctcttagatc tccgaagtct 420	
	ctgaacaggt gttgagccgg ttgcagacaa caaaacaggt gggcctgagg gcccgcggc 480	
10	gatacagtta gggagaac atg aag gca atc agt cgg gtg ctg atc gcg atg 531	
	Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met	
	1 5 10	
15	gtt gca gcc atc gcg gcg ctt ttc acg agc aca ggc acc tct cac gca 579	
	Val Ala Ala Ile Ala Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala	
	15 20 25	
20	ggc ctg gac aac gag ctg agc ctc gtt gat ggc cag gac cgc acc ctc 627	
	Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu	
	30 35 40	
25	acc gtg cag cag tgg gac acc ttc ctc aat ggt gtg ttc ccc ctg gac 675	
	Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp	
	45 50 55	
30	cgc aac cgt ctt acc cgt gag tgg ttc cac tcc ggt cgc gcc aag tac 723	
	Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr	
	60 65 70 75	
35	atc gtg gcc ggc ccc ggt gcc gac gag ttc gag ggc acg ctg gaa ctc 771	
	Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu	
	80 85 90	
40	ggc tac cag atc ggc ttc ccg tgg tcg ctg ggt gtg ggc atc aac ttc 819	
	Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe	
	95 100 105	
45	agc tac acc acc ccg aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc gct 867	
	Ser Tyr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala	
	110 115 120	
50	ccg ccg ttc ggc ctg aac tcg gtc atc acc ccg aac ctg ttc ccc ggt 915	
	Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly	
	125 130 135	
55	gtg tcg atc tcg gca gat ctg ggc aac ggc ccc ggc atc cag gaa gtc 963	
	Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val	
	140 145 150 155	
60	gca acg ttc tcg gtc gac gtc tcc ggc gcc gag ggt ggc gtg gcc gtg 1011	
	Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Val Ala Val	
	160 165 170	
65	tcg aac gcc cac ggc acc gtg acc ggt gcg gcc ggc ggt gtg ctg ctg 1059	
	Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu	
	175 180 185	
70	cgt ccg ttc gcc cgc ctg atc gcc tcg acc ggt gac tcg gtc acc acc 1107	
	Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr	
	190 195 200	
75	tac ggc gaa ccc tgg aac aac tga ttccctggacc gcccgttcgggt 1154	

This Page Blank (uspto)

Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
205 210

5 cgctgagacc gcttgagatc ggccgtccc gctccggtg tcgtcagctc atcgttgaca 1214

cgtgaactga cactcttcct agccggagcg kacgcgccga tcttgttgc tgagcagttc 1274

tcagtcgcgc cgccgcaaca ccagcgctga cggcgatcgc agcctgccc ccaccgcgcg 1334

10 ccagggacgc cccagcctgg gcaccaccc agcggtcggc acgatgcgcg gatcggtcac 1394

ctcgaacgtc tcaccgttca tcaccgcgc 1423

15

<210> 3

<211> 211

<212> PRT

20 <213> *Mycobacterium smegmatis*

25 <220>

<221> SIGNAL

<222> (1)...(27)

<223> vermutete Signalsequenz des MspA-Proteins

30 <220>

<221> PEPTIDE

<222> (28)...(211)

<223> reifes MspA-Protein

35 <400> 3

Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala
1 5 10 15

Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu
20 25 30

40 Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp
35 40 45

45 Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr
50 55 60

Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro
65 70 75 80

50 Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly
85 90 95

Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro
100 105 110

55 Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu
115 120 125

60 Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala
130 135 140

This Page Blank (uspto)

Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val Ala Thr Phe Ser Val
 145 150 155 160

5 Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala Val Ser Asn Ala His Gly
 165 170 175

Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Arg Pro Phe Ala Arg
 180 185 190

10 Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr Tyr Gly Glu Pro Trp
 195 200 205

Asn Met Asn
 210

15

20 <210> 4
 <211> 558
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

25 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<220>
 <221> CDS

30 <222> (1)...(558)
 <223> synmspA-Gen

<400> 4

35 atg ggc ctg gac aac gaa ctg tcc ctg gtt gac ggc cag gac cgt acc 48
 Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr
 1 5 10 15

ctg acc gtt cag cag tgg gac acc ttc ctg aac ggt gtt ttc ccg ctg 96
 Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu
 40 20 25 30

gac cgt aac cgt ctg acc cgt gaa tgg ttc cac tcc ggt cgt gcg aaa 144
 Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys
 35 40 45

45 tac atc gtt gcg ggt ccg ggt gcg gac gag ttc gaa ggt acc ctg gaa 192
 Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu
 50 55 60

50 ctg ggt tac cag atc ggc ttc ccg tgg tcc ctg ggt gtt ggt atc aac 240
 Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn
 65 70 75 80

55 ttc tct tac acc acc ccg aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc 288
 Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr
 85 90 95

60 gct ccg ccg ttc ggt ctg aac tct gtt atc acc ccg aac ctg ttc ccg 336
 Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro
 100 105 110

This Page Blank (uspto)

ggt gtt tct atc tct gct gat	ctg ggc aac ggt ccg	ggt atc cag gaa	384
Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp	Leu Gly Asn Gly Pro	Gly Ile Gln Glu	
115	120	125	
5 gtt gct acc ttc tct gta gac	gtc tct ggt gct gaa	ggt ggt gtt gct	432
Val Ala Thr Phe Ser Val Asp	Val Ser Gly Ala Glu	Gly Gly Val Ala	
130	135	140	
10 gtt tct aac gct cac ggc	acc gtt acc ggt gct	ggc ggt gtt ctg	480
Val Ser Asn Ala His Gly	Thr Val Thr Gly Ala	Ala Gly Gly Val Leu	
145	150	155	160
15 ctg cgt ttc gct cgt ctg	atc gct tct acc ggt gac	tct gtt acc	528
Leu Arg Pro Phe Ala Arg	Leu Ile Ala Ser	Thr Gly Asp Ser Val Thr	
165	170	175	
20 acc tac ggt gaa ccg tgg	aac atg aac tga		558
Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn	Met Asn		
	180	185	

25 <210> 5			
<211> 185			
<212> PRT			
<213> Künstliche Sequenz			
30 <220>			
<221> PEPTIDE			
<222> (1)...(184)			
<223> rMspA			
35 <220>			
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch			
40 <400> 5			
Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr			
1 5 10 15			
45 Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu			
20 25 30			
50 Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys			
35 40 45			
55 Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu			
50 55 60			
55 Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn			
65 70 75 80			
55 Phe Ser Tyr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr			
85 90 95			
55 Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro			
100 105 110			
60 Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu			
115 120 125			

This Page Blank (uspto)

Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala
130 135 140
5 Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu
145 150 155 160
Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr
165 170 175
10 Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
180 185

15

<210> 6
<211> 648
<212> DNA
20 <213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 6
atgaaggcaa tcagtcgggt gctgatcgcg atgattccg cgttggctgc ggcgcgtcg 60
gggttgttcg tgagcgcggg cacccttcac gcgggtctcg acaatgagct cagccttgc 120
25 gatggtcagg accgcacccct caccgtgcag cagtggata cgttcctcaa tggtgtgtc 180
cccttggacc gcaaccgtct gaccggtag tggttccact cgggtcgccg gaagtacatc 240
gtggccggcc cgggtgccga tgagttcgag ggcacgcgtgg aactcggcta ccagatcggc 300
ttccctgtgt cgctgggtgt gggcatcaac ttcaagctaca ccaccccgaa catcctgatc 360
30 gacgacggtg acatcaccgg tccgccttc ggcctcgagt cggtcatcac cccgaacctg 420
ttcccccgtg tgcgatctc gggccacctg ggcaacggcc cgggcattcca ggaagtcgc 480
acgttctcggt tcgacgtctc gggtcccgca ggcggagtag cggtctccaa cgccacggc 540
accgtcaccgg gtgcggccgg cgggtgtctg ctgcgtccgt tcgccccct gatgcctcg 600
accggtgact cggtcaccac ctacggcgaa ccctggaaaca tgaactga 648

35

<210> 7
<211> 184
40 <212> PRT
<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 7
Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu
45 1 5 10 15
Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp
20 25 30
50 Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr
35 40 45
Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu
55 50 55 60
55 Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe
65 70 75 80
60 Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Gly
85 90 95

This Page Blank (uspto)

Pro Pro Phe Gly Leu Glu Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly
100 105 110

5 Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val
115 120 125

Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Pro Ala Gly Gly Val Ala Val
130 135 140

10 Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu
145 150 155 160

Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr
165 170 175

15 Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
180

20 <210> 8
<211> 624
<212> DNA
<213> *Mycobacterium smegmatis*

25 <400> 8
gtgcgcgtacc tcgtcatgat gttcgctcta ctcgtgtccg tgacgcttgt gagccccgc 60
cctgccaacg cggtgacaa tcagtcagc gtggtcgacg gccaagggtcg cacgctgacc 120
gtgcagcaag ccgagacatt cctcaacggc gtgttccctc tcgaccggaa ccgactgacc 180
30 cgtgagtggt ttcaactccgg cccgcgccacc taccatgtgg cccgcccagg tgccgacgaa 240
ttcgaggcga cgctcgaact cgggtatcag gtcggcttcc cgtggtcatt gggcgctggc 300
atcaacttct cgtacacgac cccgaacatc ctcatcgtacg gaggcgacat caccaggccg 360
ccgttcggcc tggacaccat catcaccccc aacctttcc cccgcgtgtc catcaagtgc 420
gacctcggca acggtccccg tatccaggag gtcgcccaccc tctcggtgga cgtgaaggc 480
35 gcgaaaggag cggtcgcccgt atccaatgcg catggcaccg tgaccggcgc ggccggcggc 540
gtgctcctgc gtccgttcgc ccgttgatc gcctcgacgg gcgacagcgt caccacctac 600
ggcgagccct ggaacatgaa ctag 624

40 <210> 9
<211> 183
<212> PRT
45 <213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 9
Val Asp Asn Gln Leu Ser Val Val Asp Gly Gln Gly Arg Thr Leu Thr
1 5 10 15

50 Val Gln Gln Ala Glu Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg
20 25 30

55 Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Thr Tyr His
35 40 45

Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly
50 55 60

60 Tyr Gln Val Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser
65 70 75 80

This Page Blank (uspto)

Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Gly Gly Asp Ile Thr Gln Pro
85 90 95

5 Pro Phe Gly Leu Asp Thr Ile Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val
100 105 110

Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val Ala
10 115 120 125

Thr Phe Ser Val Asp Val Lys Gly Ala Lys Gly Ala Val Ala Val Ser
130 135 140

15 Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Arg
145 150 155 160

Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr Tyr
165 170 175

20 Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
180

This Page Blank (uspto)